نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۹، ص. ۶۶۰-۶۴۹

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 3, July-August 2020, p. 649-660

مقاله علمی-پژوهشی

اثر تلقیح باکتری‌های *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلیوم* بر خصوصیات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه جو تحت تنش شوری

رضا خدادادی[۱]- رضا قربانی نصرآبادی[۲]*- محسن علمائی[۳]- سید علیرضا موحدی نائینی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۴

چکیده

از جمله روش‌های مناسب برای مقابله با شوری، تلقیح گیاهان زراعی با انواع مختلفی از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه می‌باشد. بدین منظور آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار روی گیاه جو رقم کارون انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح تلقیح باکتری (بدون تلقیح (شاهد)، *ازتوباکتر*، *آزوسپریلوم* و تلقیح تلفیقی *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم*) و دو سطح شوری (۸ و ۱۶ دسی زیمنس‌بر متر) بودند. نتایج نشان داد که تنش شوری تاثیر منفی ودر مقابل، تلقیح باکتری تاثیر مثبت و معنی‌داری بر ویژگی‌های رشدی گیاه داشت. کاربرد تلفیقی باکتری‌های *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم* بهینه‌ترین تیمار شناخته شد. تیمار تلفیقی سبب بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه و افزایش محتوی کلروفیل در هر دو سطح شوری شد. بر این اساس، محتوی کلروفیل a، b و کل در سطح شوری بالا به ترتیب به میزان ۸۶/۴۹، ۱۱۷/۱۳۶ و ۱۲۷/۹۷درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین تیمار تلفیقی به ترتیب افزایش ۶۵/۳۹ و ۵۵/۹۴ درصدی اسیدآمینه پرولین را نسبت به شاهد در سطوح شوری ۸ و ۱۶ دسی زیمنس‌برمتر به همراه داشت. از سویی، تیمار تلفیقی در هر دو سطح شوری تاثیر معنی‌داری بر افزایش غلظت عناصر غذایی اندام هوایی داشت. بر این اساس در سطح شوری بالا به ترتیب افزایش ۸۱/۹۷، ۸۰ و ۶۶/۶۷ درصدی غلظت نیتروژن، فسفر و پتاسیم در مقایسه با شاهد مشاهده شد. تجمع یون سدیم در تمامی تیمارهای باکتریایی در هر دو سطح شوری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. این یافته‌ها نشان دهنده اثر مثبت تلقیح باکتریایی بر رشد و جذب عناصر غذایی جو تحت تنش شوری بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد، پرولین، شوری، کلروفیل

مقدمه

شوری ۷ درصد از اراضی جهان، حدود ۹۳۰ میلیون هکتار را تحت تاثیر قرار داده و روز به روز بر وسعت آن‌ها افزوده می‌شود. مطالعات جهانی نشان می‌دهد که بهره‌برداری نامناسب از اراضی طی ۴۵ سال گذشته موجب شور شدن ۶ درصد از اراضی جهان گردیده است (۲۶). حدود ۲۰ درصد کل اراضی کشور (۳۴ میلیون هکتار) تحت تاثیر شوری قرار دارد (۱۹). عدم تعادل در جذب عناصر غذایی، سمیت یونی و کاهش جذب آب به علت فشار بالای اسمزی ناشی از تجمع زیاد املاح در محلول خاک از عوامل تاثیر گذار بر رشد گیاه تحت تنش شوری می‌باشد (۴۷). کاهش فعالیت فتوسنتزی ناشی از کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش جذب دی‌اکسیدکربن و ظرفیت فتوسنتزی از دیگر اثرهای شوری بر گیاه می‌باشد (۳۰). یکی از راهکارهای مقابله با شوری، تلقیح گیاهان زراعی با انواع مختلفی از باکتری‌ها و قارچ‌های مفید خاکزی می‌باشد (۲۰).

باکتری‌های محرک رشد گیاه با داشتن سازوکارهای محرک رشدی سبب کاهش اثرات منفی شوری در گیاهان می‌شوند (۳۹). از مهم‌ترین سازوکارهای این باکتری‌ها می‌توان به توانایی تولید هورمون‌های گیاهی (۱۷)، تثبیت نیتروژن به صورت غیرهمزیست (۴۵)، حلالیت فسفات معدنی و پتاسیم معدنی (۳۳)، مقابله با عوامل بیماری‌زای گیاهی از طریق تولید سیانیدهیدروژن و تولید سیدروفور (۱۰ و ۴) اشاره کرد. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که تلقیح گیاه با باکتری‌های محرک رشد سبب بهبود شاخص‌های متعدد رشدی، فیزیولوژی و جذب عناصر غذایی در گیاه می‌گردد (۳۴). چادهری و همکاران (۱۵) در پژوهشی بر روی تلقیح گندم با جدایه های متحمل به شوری *ازتوباکتر* در یک خاک شور افزایش قابل توجهی در عملکرد و اجزای عملکرد و جذب عناصر غذایی در مقایسه

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیاران گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: rgnasr@yahoo.com
DOI: 10.22067/jsw.v34i3.81093

با شاهد مشاهده کردند. تلقیح گندم با *آزوسپیریلیوم* سبب حفظ محتوی کلروفیل، افزیش سنتز پرولین و افزایش جذب عناصر غذایی در مقایسه با شاهد شد. آن‌ها این مشاهدات را ناشی از بهبود خصوصیات رشد و فیزیولوژی گیاه در نتیجه‌ی کاربرد باکتری‌های محرک رشد در شرایط تنش شوری دانستند (۵۱). اثر هم‌افزایی باکتری‌های *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلیوم* بر گیاه، از طریق افزایش جذب عناصر غذایی، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه نظیر اکسین و اثر بر مورفولوژی ریشه در شرایط تنش شوری به اثبات رسیده است. رای و گاور (۴۴) در یک آزمایش گلدانی اثرات *ازتوباکترو آزوسپیریلیوم* را بهتنهایی و به صورت ترکیبی بر رشد و عملکرد گندم مورد مطالعه قراردادند آن‌ها مشاهده کردند که کاربرد تلفیقی دوباکتری در مقایسه با تلقیح جداگانه آن‌ها تاثیر بیشتری بر شاخص‌های رشد، عملکرد و اجزای عملکرد گندم داشت، که این موضوع را به اثرات مثبت هم‌افزایی *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلیوم* در نتیجه‌ی کاربرد تلفیقی آن‌ها نسبت دادند. به دلیل گستردگی اراضی شور و اهمیت آن، به کارگیری روش‌های مناسب برای کاهش اثرات منفی شوری به امری اجتناب ناپذیر بدیل شده استR. با توجه به اهمیت استفاده از باکتری‌های سازگار با شرایط اقلیمی و اکوسیستم خاکی هر منطقه و نیز کارایی کاربرد ترکیبی باکتری‌های محرک رشد، این پژوهش با هدف بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلیوم* بر ویژگی‌های رشد و فیزیولوژی گیاه جو رقم کارون، به صورت کاربرد منفرد و ترکیبی و همچنین درک مکانیسم‌های هم‌افزایی آن‌هادر دو سطح شوری، آستانه کاهش عملکرد و ۵۰ درصد کاهش عملکرد گیاه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه اثر باکتری‌های *Azotobacter* sp. و *Azospirillum* sp. بر ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژی گیاه جو تحت تنش شوری، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار، در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تیمارهای مورد بررسی شامل چهار سطح تلقیح باکتری (شاهد (بدون تلقیح باکتری)، تلقیح *ازتوباکتر*، تلقیح *آزوسپیریلیوم*، تلقیح تلفیقی *ازتوباکتر وآزوسپیریلیوم*) و دو سطح شوری (۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌بر متر) بود.

به منظور تهیه جدایه‌های باکتریایی، تعداد ۱۵ نمونه خاک از اراضی شور استان گلستان تهیه و ۳۲ جدایه *ازتوباکتر* با انجام آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و تولید سیست در کشت کهنه جداسازی گردید. سپس توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک، توان تحمل به تنش خشکی، تولید پلی‌ساکارید، تولید اکسین، حلالیت فسفر، حلالیت پتاسیم، تولید سیانیدهیدروژن و توان تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی جدایه‌ها بررسی شد (۲۸). پس از انجام آزمون‌های فیزیولوژیک و محرک رشدی جدایه‌های باکتریایی جدایه Az_{13} به عنوان جدایه برتر برای آزمون گلخانه‌ای انتخاب گردید (جدول ۱). جدایه برتر *آزوسپیریلیوم* از بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه گردید، که خصوصیات آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

همچنین، جهت آماده کردن خاک گلدان‌ها، نمونه‌برداری از خاک‌های شور منطقه آق‌قلا صورت گرفت و خاکی با مشخصات جدول ۲ مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به هدف این پژوهش که بررسی تاثیر تیمارهای آزمایشی در دو سطح شوری آستانه کاهش عملکرد و ۵۰ درصد کاهش عملکردگیاه جو بود، خاکی با شوری ۱۶ دسی‌زیمنس‌برمتر انتخاب گردید سپس با اعمال آبشویی میزان شوری خاک به ۸ دسی‌زیمنس‌برمتر (آستانه کاهش عملکرد) کاهش یافت. پس از اتمام آبشویی و رسیدن به شوری مورد نظر، خاک از گلدان‌ها خارج شده و پس از هوا خشک و کوبیده شدن، دوباره به داخل گلدان‌ها انتقال داده شد. برای تامین نیاز غذایی گیاه در طول فصل رشد بر اساس نتایج آزمون خاک مقادیر بهینه‌ای نیتروژن، فسفر و پتاسیم به ترتیب از منابع اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم استفاده گردید.

جدول ۱- نتایج آزمون‌های فیزیولوژیک و محرک رشدی جدایه‌های باکتری

Table 1- Results of physiological and growth stimulation tests of bacterial isolates

جدایه Isolate	رشد کیفی در محیط ۵٪ نمک Qualitative growth in 5% salt	انحلال فسفر Phosphorous solubility (mg/l)	تولیداکسین IAA production (mg/l)	آزادسازی پتاسیم Potassium Release (mg/l)	تثبیت نیتروژن Nitrogen fixation ($nmolC_2H_4/h$)	سیانید هیدروژن Hydrogen cyanide	تولید پلی‌ساکارید Polysaccharide production (mg/l)
Azotobacter	+++	215.5	61.2	28.3	7.04	+	5.2
Azospirillum	++	78.45	35.4	5.34	9.24	−	----

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

Table 2- Physical and chemical properties of the studied soil

شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	بافت خاک Soil texture	هدایت الکتریکی EC (dS/m^{-1})	pH	کربن آلی OC (%)	نیتروژن N (%)	فسفر P (mg/kg)	پتاسیم K (mg/kg)
11	60	29	Silty clay lome	16.5	7.8	0.85	0.07	7.3	312.8

در این پژوهش بذر جو رقم کارون مورد استفاده قرارگرفت. تعداد کافی از بذور سالم انتخاب شدند و به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۹۶ درصد و سپس ۲-۱/۵ دقیقه در محلول سدیم هیپوکلریت ۲/۵ درصد ضد عفونی شدند و با آب مقطر استریل ۸-۷ مرتبه شستشو شدند (۶). به منظور تهیه مایه تلقیح ابتدا باکتری‌های مورد نظر در محیط پیش کشت مایع مغذی رشد داده شدند و پس از یکسان سازی جمعیت باکتریایی به مقدار دو درصد حجمی به محیط کشت مایع مغذی تلقیح انجام گرفت و بر روی شیکر انکوباتوردار (۱۲۰ دور در دقیقه) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸/۳ درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند. پس از رشد مناسب جدایه‌های باکتریایی بر روی هر بذر مقدار یک میلی‌لیتر باکتری تلقیح گردید. در طول دوره رشد آبیاری با آب مقطر با شوری کم‌تر ۱ دسی‌زیمنس‌برمتر صورت گرفت. برداشت گیاهان پس از گذشت ۷۰ روز (اواخر دوره رشد رویشی) انجام شد. سپس شاخص های وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، ارتفاع گیاه، کلروفیل a، b و کلروفیل کل گیاه (۵)، پرولین برگ (۹) و غلظت عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و سدیم در اندام هوایی (۱) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی نشان داد که اثرات اصلی و همچنین اثرات متقابل باکتری وشوری بر شاخص‌های رشدی گیاه در سطح احتمال یک درصد ($P<0/01$) معنی دار بودند (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در هر دو سطح شوری (۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌برمتر) بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی به ترتیب با میانگین ۵/۸۲ و ۳/۸۲ گرم مربوط به تیمار کاربرد تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* بود. همچنین کمترین مقدار وزن خشک اندام هوایی در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیک گیاه

Table 3- Analysis of variance (ANOVA) for the effects of experimental treatments on plant growth and physiological parameters

منابع تغییر Source of variance	درجه آزادی Degrees of freedom	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (g/pot)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g/pot)	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	کلروفیلa Chlorophyll a (mg/g^{-1}fW)	کلروفیلb Chlorophyll b (mg/g^{-1}fW)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g^{-1}fW)	پرولین Proline mol/g^{-1} fW)µ(
باکتری Bacteria	3	5.46**	12.95**	45**	33.88**	14.17**	91.72**	70.28**
شوری Salinity	1	21.64**	8.1**	69.83**	48.87**	19.08**	129.03**	257.67**
باکتری×شوری Bactria* Salinity	3	0.36**	0.34**	5.3**	5.21**	3.3**	16.54**	1.9*
خطا Error	48	0.0025	0.015	0.052	0.48	0.26	0.96	0.67
ضریب تغییرات Coefficient of variation		1.38	0.8	1.39	11.13	11.33	9.08	4.53

تیمارهای اصلی باکتری تاثیر متفاوتی بر وزن خشک اندام هوایی داشتند به طوری که در هر دو سطح شوری بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار *ازتوباکتر* بود که تفاوت معنی‌داری نسبت به *آزوسپیریلیوم* داشت (جدول ۴). نهرا و همکاران (۳۷) گزارش کردند که کاربرد باکتری‌های محرک رشد در گیاه سبب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی نسبت به شاهد شد. آن‌ها این موضوع را به خصوصیات محرک رشدی باکتری‌ها به خصوص تثبیت نیتروژن مولکولی نسبت دادند. در گیاهان تلقیح شده با باکتری محرک رشد، جذب آب بیش‌تر و درنتیجه فشار تورژسانس بالاتر رفته و منجر به بهبود تغذیه و رشد بیش‌تر اندام هوایی و ریشه می‌شود (۳۹). بر اساس نتایج با افزایش سطح شوری میزان وزن خشک ریشه کاهش یافت (جدول ۴). در شرایط تنش شوری روزنه‌های هوایی بسته شده و میزان فتوسنتز کاهش می‌یابد و در نهایت رشد ریشه متوقف می‌شود (۲). تلقیح باکتری سبب کاهش معنی‌دار اثر تنش شوری بر وزن خشک ریشه گیاه شد به طوریکه کاربرد تلفیقی باکتری‌ها سبب افزایش معنی‌دار ۱۷۸/۲۴ و ۲۲۷/۷۸ درصدی وزن خشک ریشه به ترتیب در سطوح شوری ۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌بر متر در مقایسه با شاهد شد (جدول ۴). اگامبردیوا و هافلیچ (۱۷) مشاهده کردند که کاربرد باکتری ریزوسفری محرک رشد شامل *ازتوباکترو آزوسپیریلیوم* سبب افزایش وزن خشک ریشه نخود در مقایسه با شاهد شد، بیشترین میزان افزایش در تیمار تلفیقی*ازتوباکتر* و *آزوسپیریلیوم* مشاهده گردید که با نتایج حاضر مطابقت دارد. نارولا و همکاران (۳۶) در پژوهشی پیرامون کاربرد *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم* در گندم بیان داشتند که کاربرد تلفیقی باکتری‌ها سبب افزایش شاخص‌های رشد از جمله وزن خشک ریشه نسبت به تیمار شاهد شد که این موضوع ناشی از ویژگی‌های محرک رشدی و تولید اسمولیت‌های آلی و معدنی توسط جدایه‌های باکتریایی بوده است.

سطوح شوری اثرات متفاوت و معنی‌داری بر ارتفاع گیاه داشتند. با افزایش شوری میزان ارتفاع گیاه به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴). برخی از محققین علت این کاهش را به کاهش جذب آب و عناصرغذایی به دلیل بر هم خوردن تعادل عناصر غذایی نسبت داده‌اند و برخی دیگر افزایش تولید اتیلن در شرایط تنش شوری را از دیگر علل کاهش ارتفاع گیاه دانسته‌اند (۷ و ۲۲).

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های رشد و فیزیولوژیک گیاه

Table 4- Mean comparison for the effects of experimental treatments on plant growth and physiological parameters

شوری Salt	باکتری Bacterial	وزن خشک اندام هوایی Dry weight shoot (g/pot)	وزن خشک ریشه Dry weight root (g/pot)	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	کلروفیلa Chlorophyll a mg/g^{-}) (^{1}fW	کلروفیلb Chlorophyll b (mg/g^{-1}fW)	کلروفیل کل Total chlorophyll mg/g^{-}) (^{1}fW	پرولین Proline Mol/g^{-1} fW)µ(
S_1	Control	3.08^{d}	2.16^{f}	15.4^{d}	8.05^{c}	5.67^{d}	13.72^{c}	10.98^{e}
	Azotobacter	5.05^{a}	4.83^{b}	18.56^{b}	11.55^{b}	9.06^{b}	20.61^{b}	15.86^{d}
	Azospirillum	4.71^{b}	4.71^{c}	18.39^{b}	11.24^{b}	8.44^{c}	19.69^{b}	14.55^{d}
	Azot×Azos	5.82^{a}	6.01^{a}	20.25^{a}	13.64^{a}	10.65^{a}	24.3^{a}	18.16^{c}
S_2	Control	1.50^{g}	1.26^{g}	9.4^{e}	3.59^{e}	2.8^{f}	6.4^{e}	15.91^{d}
	Azotobacter	2.81^{e}	3.84^{e}	16.54^{c}	7.12^{d}	5.12^{e}	12.24^{d}	23.16^{b}
	Azospirillum	2.52^{f}	3.82^{e}	16.36^{c}	6.78^{d}	4.78^{e}	11.57^{d}	21.88^{b}
	Azot×Azos	3.82^{c}	4.13^{d}	17.77^{c}	8.49^{c}	6.1^{d}	14.59^{c}	24.81^{a}

Azot×Azos: تیمار تلفیقی ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم، S_1: شوری ۸دسی‌زیمنس‌برمتر، S_2: شوری ۱۶ دسی‌زیمنس‌برمتر

Salinity 16 ds/m:S_2 ,Salinity 8 dS/m :S_1,Combined treatment of Azotobacter and Azospirillum:Azot×Azos

-اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۱) نمی‌باشند.

- Numbers with common letters in each column were not significantly different (P <0.01)

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، بیشترین میزان ارتفاع گیاه در هر دوسطح شوری (۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌بر متر) مربوط به تیمار کاربرد تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* بود که به ترتیب با میانگین ۲۰/۲۵ و ۱۷/۷۷ سانتی‌متر، افزایش معنی‌دار ۳۱/۴۹، ۸۹/۰۴ درصدی را نسبت به شاهدها نشان دادند. پس از تیمار تلفیقی باکتریایی، تیمار اصلی*ازتوباکتر* بیشترین میزان ارتفاع گیاه نسبت به شاهد را در هر دو سطح شوری به خود اختصاص داد. این در حالی بود که تیمارهای اصلی *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلیوم*در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۴). پسرکلی و همکاران (۴۱) ارتفاع گیاه را از صفات رایج برای تعیین میزان تحمل به شوری و یکی از مهم‌ترین شاخص‌های رشد گیاه معرفی کردند. دوبلاری و همکاران (۱۶) افزایش ارتفاع گیاه در اثر کاربرد باکتری‌های *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم* را در مقایسه با شاهد گزارش کردند. آن‌ها بیان داشتند که اثر هم افزایی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* سبب تحریک رشد گیاه به خصوص تولید فیتوهورمون‌ها و افزایش تولید مواد فتوسنتزی بیشتر در گیاه شده که این مواد شرایط مناسبی را برای طویل شدن ساقه فراهم می‌کند. باکتری‌های محرک رشد با کاهش سطح هورمون گیاهی اتیلن در گیاه منجر به تغییرات رشد و نمو گیاه و افزایش ارتفاع گیاه می‌شوند (۲۴).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی و همچنین اثر متقابل تیمارهای باکتری و شوری بر میزان محتوی کلروفیل گیاه در سطح احتمال یک درصد (P<۰/۰۱) معنی‌دار بودند (جدول ۳). افزایش شوری تاثیر منفی معنی‌داری بر محتوی کلروفیل b،a و کلروفیل کل برگ داشت و سبب کاهش محتوی کلروفیل در گیاه گردید (جدول ۴). پاری‌هار و همکاران (۴۰) بیان داشتند که شوری با کاهش جذب عناصرغذایی منجر به کاهش محتوی کلروفیل گیاه می‌شود. این کاهش ممکن است نتیجه تشکیل آنزیم‌های پروتئولیتیک نظیر کلروفیلاز باشد که باعث تجزیه کلروفیل می‌گردد و به سیستم فتوسنتزی آسیب می‌رساند. تلقیح باکتری سبب افزایش محتوی کلروفیل گیاه در مقایسه با شاهد، در هر دو سطح شوری گردید (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در سطح شوری ۸ دسی‌زیمنس‌بر متر بیشترین میزان کلروفیل b،a و کلروفیل کل در تیمار کاربرد تلفیقی *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم* به ترتیب با میانگین‌های ۱۳/۶۴، ۱۰/۶۵ و ۲۴/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ مشاهده شد. که در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار ۶۹/۴۴، ۸۷/۸۳، ۷۷/۱۱ درصدی را نشان داد. بیشترین میزان کلروفیل b،a و کلروفیل کل در سطح شوری ۱۶ دسی‌زیمنس‌برمتر نیز مربوط به تیمارکاربرد تلفیقی *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم* بود که به ترتیب با میانگین ۸/۴۹، ۶/۱ و ۱۴/۵۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ، افزایش معنی‌دار ۱۳۶/۴۹، ۱۱۷/۸۶ و ۱۲۷/۹۷ درصدی را نسبت به شاهد نشان دادند (جدول ۴). نتایج نشان داد که بعد از تیمار تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* به عنوان تیمار بهینه تیمار اصلی *ازتوباکتر* منجر به بیش‌ترین محتوی کلروفیل در هر دو سطح شوری گردید، اگر چه تفاوت آماری معنی داری را با تیمار *آزوسپیریلیوم* نشان نداد (به جز در مورد کلروفیل b سطح یک شوری) (جدول ۴). باکتری‌های ریزوسفری با داشتن خصوصیات محرک رشدی سبب بهبود وافزایش جذب عناصرغذایی در گیاه شده که در نتیجه‌ی آن محتوی کلروفیل و بالطبع فتوسنتز در گیاه افزایش می‌یابد (۸). بهبود محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل در اثر تلقیح با باکتری‌های محرک رشد در شرایط تنش شوری در گیاهانی همچون آفتابگردان (۳۲) و سویا (۲۳) گزارش شده است که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی تیمارهای باکتری و شوری در سطح یک درصد آماری (P<۰/۰۱) و اثر متقابل باکتری× شوری در سطح ۵ درصد (P<۰/۰۵) بر میزان پرولین گیاه معنی‌دار بودند (جدول ۳). بر اساس جدول ۴، با افزایش میزان شوری، میزان پرولین در گیاه افزایش یافت. همچنین، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در هر دو سطح شوری (۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌بر متر) بیشترین میزان پرولین مربوط به تیمار تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* بود که به ترتیب با میانگین‌های ۱۸/۱۶ و ۲۴/۸۱ میکرومول بر گرم وزن تر افزایش معنی‌دار ۶۵/۳۹ و ۵۵/۹۴ درصدی را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (جدول ۴). اسید آمینه پرولین از ترکیبات تنظیم کننده اسمزی است که غلظت آن تحت شرایط تنش‌های محیطی مانند شوری افزایش می‌یابد (۴۲). انباشتگی پرولین در گیاه در شرایط تنش شوری، به افزایش آنزیم‌های سنتزکننده پرولین و یا کاهش آنزیم‌های اکسیدکننده آن نسبت داده شده است (۴۳). باکتری‌های محرک رشد از طریق کمک به افزایش سنتز پرولین، در کاهش خسارات ناشی از رادیکال‌های آزاد و تنش اکسایشی در گیاهان تحت تنش شوری نقش ایفا می‌کنند (۲۹).

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی نشان داد که اثرات اصلی باکتری و شوری در سطح یک درصد آماری و همچنیناثر متقابل باکتری و شوری در سطح پنج درصد (P<۰/۰۱) بر غلظت نیتروژن اندام‌هوایی معنی‌دار شدند (جدول ۵). شوری سبب کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن اندام‌هوایی گردید (جدول ۶) پسرکلی و همکاران (۴۱) بیان کردند که کاهش میزان نیتروژن در نتیجه تنش شوری از عوامل مهم کاهش رشد گیاهان به شمار می‌رود، آن‌ها گزارش کردند که در شرایط تنش شوری، از جذب و آسیمیلاسیون نیترات ممانعت به عمل می‌آید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تلقیح باکتری سبب افزایش غلظت نیتروژن اندام هوایی نسبت به شاهد شد.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت عناصر غذایی گیاه

Table 5- Analysis of variance (ANOVA) for the effects of experimental treatments on plant nutrients concentration

منابع تغییر Source of variance	درجه آزادی Degrees of freedom	نیتروژن N (٪)	فسفر P (٪)	پتاسیم K (٪)	سدیم Na (٪)
باکتری Bacterial	3	1.15**	0.039**	0.52**	0.108**
شوری Salt	1	0.87**	0.026**	1.068**	0.00019**
باکتری×شوری Bactria* Salinity	3	0.36*	0.0007**	0.055**	0.09**
خطا Eroor	48	0.003	0.0003	0.003	0.00011
ضریب تغییرات Coefficient of variation		4.47	2.82	4.5	0.67

بر اساس نتایج بیشترین غلظت نیتروژن در هر دو سطح شوری ۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌برمتر مربوط به تیمار تلفیقی *ازتوباکتر ×آزوسپیریلیوم* بود که به ترتیب با میانگین‌های ۲/۹۷ و ۲/۲۲ درصد افزایش معنی‌دار ۱۲۰ و ۸۱/۹۷ درصدی را نسبت به شاهد نشان دادند (جدول ۴). نتایج جدول ۲ حاکی از مطلوب بودن ویژگی‌های محرک رشدی (تثبیت بیولوژیک نیتروژن، اکسین و ...)جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش می‌باشد. بر این اساس احتمالا علت افزایش غلظت نیتروژن گیاه در تیمارهای تلقیح باکتری به خصوص کاربرد تلفیقی آن‌ها می‌تواند تاثیر مثبت باکتری‌های محرک رشد در تثبیت بیولوژیک نیتروژن و همچنین افزایش جذب نیتروژن از خاک - باشد. هوفلیک و همکاران (۲۵) بیان کردند که افزایش میزان نیتروژن گیاه در اثر تلقیح توام باکتری‌های *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم* در شرایط تنش شوری ناشی از اثرات مثبت هم‌افزایی این باکتری‌ها در تثبیت زیستی نیتروژن می‌باشد. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در سطح شوری پایین‌تر (۸ دسی‌زیمنس‌برمتر) پس از تیمار تلفیقی، تیمار اصلی *آزوسپیریلیوم* بیشترین مقدار غلظت نیتروژن گیاه را سبب شد در حالی که در سطح شوری بالاتر (۱۶ دسی‌زیمنس‌برمتر) بیش‌ترین مقدار نیتروژن مربوط به تیمار اصلی *ازتوباکتر*بود. این موضوع احتمالا مربوط به قابلیت بالای این جدایه برای سازگاری در شرایط شور و بهینه‌بودن فاکتورهای محرک رشد در شرایط تنش شوری می‌باشد (جدول ۲) که توانسته در شوری بالاتر تاثیر مطلوب‌تری بر جذب عناصر غذایی در گیاه داشته باشد. در هر دو سطح شوری تیمارهای اصلی باکتری در یک گروه آماری قرارگرفتند (جدول ۶). سانتی و همکاران (۴۵) بیان کردند که در شرایط تنش شوری باکتری‌های محرک رشد از طریق محدود نمودن جذب کلر موجب افزایش جذب نیترات در گیاه می‌شوند.کائو و همکاران (۲۷) رقابت یون‌های کلر ونیترات در فرایند جذب توسط گیاه تحت تنش شوری را مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند که رقابت موجود بین یون‌های مذکور به پتانسیل منفی سلول‌های ریشه، بار منفی این یون‌ها (کلر ونیترات) و جذب یون‌ها توسط سیستم‌های ناقل یکسان، مربوط می‌گردد. بر اساس نتایج آزمون‌های محرک رشدی باکتری، جدایه *ازتوباکتر* مورد استفاده در این پژوهش دارای بیشترین میزان تولید هورمون رشد (اکسین) بود (جدول ۲) طبق نظر باشان و همکاران (۱۱) افزایش کارایی جذب عناصرغذایی توسط گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های مولد هورمون اکسین می‌تواند به دلیل افزایش سطح جذب ریشه در اثر تلقیح با این باکتری‌ها باشد. چندراشیکار و همکاران (۱۴) بیان کردند که باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق افزایش تارهای کشنده و در نتیجه افزایش سطح ریشه، نقش مهمی در عرضه نیترات برای گیاه دارند، این نتیجه با نتایج حاصل از وزن خشک ریشه در این پژوهش مطابقت دارد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای اصلی و همچنین برهمکنش متقابل باکتری و شوری بر غلظت فسفر اندام‌هوایی در سطح یک درصد آماری (P<۰/۰۱) معنی‌دار بود (جدول ۵). با افزایش میزان شوری غلظت فسفر اندام‌هوایی به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۶). بارگز وهمکاران (۱۲) بیان کردند که با افزایش شوری خاک فعالیت یون کلسیم زیاد شده و سبب تشکیل فسفات‌های کلسیم با حلالیت کم‌تر می‌گردد وبه سبب آن، بسیاری از گیاهان توان جذب فسفر را در خاک‌های شور ندارند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در هر دو سطح شوری (۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌بر متر) بیشترین غلظت فسفر مربوط به تیمار تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* بود که به ترتیب با میانگین‌های ۰/۳۶، ۰/۲۷ درصد، افزایش معنی‌دار ۵۶/۵۲ و ۸۰ درصدی را نسبت به شاهد رقم زدند (جدول ۶). علی‌رغم اینکه کود

فسفر به مقدار برابر در اختیار گیاه و تیمارهای آزمایشی قرار گرفت، نتایج متفاوت و اختلاف معنی‌دار بین تیمارها وجود داشت و این می تواند احتمالا ناشی از توان انحلال فسفات معدنی نامحلول خاک توسط جدایه‌های باکتریایی باشد. نصرتی و همکاران (۳۸) در بررسی حلالیت فسفر جدایه‌های ازتوباکتر بیان داشتند که جدایه ازتوباکتر وینلندی o_4 بیشترین مقدار حلالیت فسفر به صورت کمی (۰/۱±۳/۵ میلی‌گرم در لیتر) و کیفی (۲۱/۵ میلی‌متر) از خود نشان داد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که پس از تیمار کاربرد تلفیقی جدایه‌های باکتریایی، تیمار اصلی *ازتوباکتر* در هر دو سطح شوری بیشترین غلظت فسفر اندام هوایی را سبب شد (جدول ۶). نتایج خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های باکتریایی نشان دهنده‌ی کارایی بهتر *ازتوباکتر* نسبت به *آزوسپیریلیوم* در میزان حلالیت فسفات معدنی بود (جدول ۲). ناروالا و همکاران (۳۶) در یک آزمایش گلخانه‌ای اثر تلقیح ژنوتیپ‌های مختلف گندم را با سویه‌های مختلف *ازتوباکترکروکوکوم* بررسی کردند. آن‌ها گزارش نمودند که غلظت و جذب فسفر در تیمارهای تلقیح شده در مقایسه با شاهد به طور معنی‌دار افزایش یافت. آن‌ها بیان داشتند که سویه‌ای که بیشترین تاثیر را در افزایش غلظت فسفر اندام‌هوایی داشت، بیشترین میزان حلالیت فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات را داشته که این موضوع با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. همچنین آن‌ها بیان نمودند که سویه‌ی باکتری احتمالا توانسته با انحلال فسفر نامحلول ریزوسفر و همچنین تولید فیتوهورمون‌های رشدی (اکسین)، سبب انتقال بهتر فسفر به بخش هوایی شود. زارعی و همکاران (۵۱) گزارش کردند که تلقیح گندم با *آزوسپیریلیوم* و قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا سبب افزایش مقدار جذب عناصر غذایی به خصوص فسفر در مقایسه با تیمار شاهد شد، آن‌ها بیان داشتند که ریزجانداران با کاهش pH ریزوسفر از طریق ساخت و رهاسازی اسیدهای‌آلی سبب حل‌کردن کانی‌های فسفره نامحلول و تبدیل آن‌ها به فرم قابل جذب برای گیاه شده و از این طریق سبب افزایش میزان جذب فسفر در گیاه می‌شوند.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر تیمارهای اصلی و همچنین برهمکنش متقابل باکتری و شوری بر غلظت سدیم و پتاسیم در سطح یک درصد آماری ($P<0/01$) معنی‌دار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که درتمامی تیمارها با افزایش سطح شوری غلظت سدیم افزایش یافت. از طرفی در هر دو سطح شوری در گیاهان تلقیح شده، غلظت سدیم در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری داشتند، که این موضوع نشان‌دهنده تاثیر مثبت تلقیح باکتری در کاهش اثر منفی شوری می‌باشد (جدول ۶). کمترین غلظت سدیم در اندام هوایی در هر دو سطح شوری ۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر مربوط به تیمار تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* بودکه به ترتیب با میانگین‌های ۱/۰۵ و ۱/۱۵ درصد، کاهش‌های معنی‌دار ۳۶/۳ و ۳۹/۱۵ درصدی غلظت سدیم را نسبت به شاهدها نشان دادند. افزایش غلظت سدیم می‌تواند به دلیل فراوانی یون‌های سدیم در محیط ریشه و کاهش رشد گیاه در اثر سمیت یون سدیم در سطوح شوری بالا باشد. بر اساس نتایج در هر دو سطح شوری ۸ و ۱۶دسی‌زیمنس‌برمتر بیش‌ترین غلظت پتاسیم در تیمار تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* به ترتیب با میانگین‌های ۲/۲۴ و ۱/۴۵ درصد مشاهده شد که با افزایش ۸۵/۱۲ و ۶۶/۶۷ درصدی نسبت به شاهد، اختلاف آماری معنی‌داری را نسبت به این تیمار نشان دادند (جدول ۶). غلظت بیش‌تر سدیم نسبت به پتاسیم در محیط شور و رقابت این یون با پتاسیم در فرایند جذب توسط گیاه در خاک‌های شور سبب کاهش جذب پتاسیم، سمیت سدیم و کاهش نسبت پتاسیم به سدیم شده که این موضوع کاهش رشد گیاه را به همراه دارد (۵۲).

زاکی و همکاران (۵۰) نشان دادند که افزایش غلظت پتاسیم در شرایط تنش شوری می‌تواند اثرات مضر شوری بر رشد و عملکرد گیاه را کاهش دهد. باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق تغییر در انتخاب‌پذیری یون‌های سدیم و پتاسیم جهت جذب توسط گیاه و در نتیجه محدود نمودن جذب سدیم، موجب افزایش جذب پتاسیم می شوند (۲۲). یلدریم و همکاران (۴۹) بیان کردند که باکتری‌های محرک رشدی یون سدیم را در ریشه گیاه انباشت کرده و از انتقال آن به اندام‌هوایی جلوگیری می‌کنند اشرف و همکاران (۳) گزارش کردند که افزایش جمعیت باکتری‌های مولد پلی‌ساکارید برون سلولی در منطقه ریشه، مقدار سدیم قابل دسترس برای جذب گیاه را کاهش و در نتیجه سبب افزایش مقاومت گیاه به تنش شوری می‌گردند.آن‌ها بیان داشتند که این باکتری‌های از طریق برقراری پیوند سدیم با پلی ساکاریدهای تولیدی سبب کاهش جذب سدیم توسط گیاه می‌شوند. بر اساس نتایج خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های باکتریایی (جدول ۲) جدایه‌ی *ازتوباکتر* توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید را از خود نشان داده، که احتمالا این ویژگی تاثیر مثبتی در کاهش جذب سدیم و همچنین افزایش مقاومت گیاه به تنش شوری داشته است.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که با افزایش شوری خاک، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، ارتفاع گیاه، محتوی کلروفیل و غلظت عناصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم کاهش و از طرفی میزان پرولین و همچنین غلظت سدیم اندام هوایی در گیاه جو به طور معنی‌داری افزایش یافت. تلقیح باکتری‌های مقاوم به شوری *ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم*سبب کاهش اثرات نامطلوب شوری بر فاکتورهای رشد و فیزیولوژیک گردید، که این اثر در جدایه *ازتوباکتر* بیش‌تر از *آزوسپیریلیوم* بود.

جدول ٦- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت عناصر غذایی در گیاه

Table 6- Mean comparison for the effects of experimental treatments on plant nutrients concentration

شوری Salt	باکتری Bacterial	نیتروژن N (٪)	فسفر P (٪)	پتاسیم k (٪)	سدیم Na (٪)
	Control	1.35 d	0.23 d	1.21 f	1.65 b
S_1	Azotobacter	1.99 b	0.32 b	2.06 b	1.23 e
	Azospirillum	2.31 b	0.27 c	1.92 c	1.31 d
	Azot×Azos	2.97 a	0.36 a	2.24 a	1.05 g
	Control	1.22 e	0.15 f	0.87 g	1.89 a
S_2	*Azotobacter*	1.82 c	0.21 e	1.36 e	1.31 d
	Azospirillum	1.67 cd	0.19 e	1.32 e	1.39 c
	Azot×Azos	2.22 b	0.27 c	1.45 d	1.15 f

Azot×Azos: تیمار تلفیقی ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم، S_1: شوری ۸دسی‌زیمنس‌برمتر، S_2: شوری ۱۶ دسی‌زیمنس‌برمتر

Azot×Azos: Salinity 16 ds/m:S_2 ,Salinity 8 dS/m :S_1,Combined treatment of Azotobacter and Azospirillum.

-اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۱) نمی‌باشند.

- Numbers with common letters in each column were not significantly different (P <0.01).

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد تلفیقی *ازتوباکتر×آزوسپیریلیوم* اثر قابل‌توجهی بر افزایش وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی، ارتفاع گیاه، میزان کلروفیل و غلظت عناصر غذایی (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) و کاهش غلظت سدیم در هر دو سطح شوری (۸ و ۱۶ دسی‌زیمنس‌بر متر) در مقایسه با کاربرد باکتری‌ها به صورت انفرادی داشت. بر اساس نتایج این تحقیق، کاربرد تلفیقی جدایه *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلیوم* روشی مناسب جهت استفاده در آزمایش‌های گلدانی با خاک‌های شور است. در عین حال، برای کاربردی شدن این نتایج، انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای در خاک های شور به منظور ارزیابی اثر این جدایه های باکتریایی در افزایش رشد و بهبود خصوصیات فیزیولوژیک و تولید گیاه توصیه می‌شود.

منابع

1- Ali Ayyayi M. 1997. Descriptions of methods for soil chemical analysis. Volume II No. 1024, Soil and Water Research Institute, Tehran. (In Persian)

2- Ahmad P.A., ozturk M.U., and satyawati S.H. 2014. Effect of sodium carbonate-indaced salinity alkalinity on some osmoprotectahts, protein profile antioxidant enzymes and lipid peroxidantion in two mulberry. Plant Interactions 9:460-467.

3- Ashraf M., Hasnain S., and Hussain F. 2005. Exopolysaccharides(exopolysaccharide)producing biofilm bacteria in improving physicochemical characteristics of the saltaffected soils. Proceedings of the International Conference on EnvironmentallySustainable Development.

4- Arora N.K., Tewari S., Singh S., Lal N., and Maheshwari D.K. 2012. PGPR for protection of plant health under saline conditions. Bacteria in Agrobiology, Stress Management 239–258.

5- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24-1: 1.

6- Arzanesh M.H., Alikhani H.A., Khavazi K., Rahimian H.A., and Miransari M. 2011. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by Azospirillum sp. under drought stress. World Journal Microbiology Biotechnology 27: 197-205.

7- Munns R., and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biology 59: 651-681.

8- Asghari B., and Musarrt J. 2009. Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with Rhizobium and Pseudomonas. Biology and Fertility of Soils 45: 405-413.

9- Bates L.S., Waldren R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39(1): 205-207.

10- Bhardwaj D., Ansari MW., Sahoo RK., and Tuteja N. 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. Microbial Cell Factories 13: 66.

11- Bashan Y., Holguin G., and de-Bashan L. E. 2004. Azospirillumplantrelationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology 50-8: 521-577.
12- Bargaz A., Nassar R.M.A., Rady M.M., Gaballah M.S., and Thompsn S.M. 2016 . Improved Salinity Tolerance by Phosphorus Fertilizer in Two Phaseolus vulgaris Recombinant Inbred Lines Contrasting in Their P-Efficiency. Agronomy and Crop Science 202: 497-507.
13- Beinsan C., Camen D., Sumalan R., and Babou M. 2000. Study concerning salt stress effect on leaf area dynamics and chlorophyll content infour bean local landraces from Banat area. International symposium on Agriculture, Romania.
14- Chandrasekar B.R., Ambrose G., and Jayabalan N. 2005. Influence of biofertilizers and nitrogen source level on the growth and yield of Echinochloa frumentacea. Journal of Agricultural Technology 1: 223–234.
15- Chaudhary D., Narula N.S.S., and Sindhu R.K., Behl. 2013. Plant growth stimulation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by inoculation of salinity tolerant Azotobacter strains. Physiology and Molecular Biology of Plants 19(4): 515–519.
16- Dobbelaere S., Vanderleyden J., and Okon Y. 2003. Plant growth promoting effect of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Review Inplant Science 22-2: 107-149.
17- Egamberdiyevaa D., and Hoflich, G. 2003. Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. Soil Biology and Biochemistry 35: 973–978.
18- Egamberdiyeva D., and Lugtenverg B. 2015. Use of plant Growth- ptomoting Rhizobacteria to Alleviates alinity stress in plants. Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses 1:73-96.
19- FAO. 2010. Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. Available at http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spuch/topic4.htm.
20- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-117.
21- Harley J.L., and Smith S.E. 2000. Azotobacter Symbiosis. Academic Press, London.
22- Hamdi M.A., Shaddad M.A.K., and Doaa M.M. 2004. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of Azospirillum brasilense inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. Plant Physiology 44: 165.
23- Han H.S., and Lee K.D. 2005. Physiological Responses of Soybean - Inoculation of Bradyrhizobium japonicum with PGPR in Saline Soil Conditions. Agricultural and Biological Sciences 1: 216-221.
24- Heydarian Z., Yu M., Gruber M., Glick BR., Zhou R., and Hegedus DD. 2016. Inoculation of Soil with Plant Growth Promoting Bacteria Producing 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase or Expression of the Corresponding acdS Gene in Transgenic Plants Increases Salinity Tolerance in *Camelina sativa*. Frontiers in Microbiology 7: 1966.
25- Hoflich G., Wichc W., and Kuhn G. 1982. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms in salt stress. Experientia 50(10): 897-905.
26- Kafi M., and Khan M.A. 2008. Relatve salt tolerance of south Khorasan millets. Desert 14: 63-71.
27- Kao W.Y., Tasai, H.C. and Tasi T.T. 2001. Effect of Nacl and nitrogen availability on growth and photosynthesis of seedlings of a mangrove species *Kandelia candel* (L.) Druce. Journal of Plant Physiology 158: 841-846.
28- Krieg N. R. 2005. Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, 1136p.
29- Kumar T.S., Swaminathan V., and Kumar S. 2009. Influence of nitrogen phosphorus and biofertilizers on growth yield and essential oil constituents in ratoon crop of davana (*Artemisia pallens* Wall.). Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry 8:86-95.
30- Maas E.V., and Hoffman G.J. 1977. Crop salt tolerance–current assessment. Journal of the Irrigation and Drainage Division 103(2): 115-34.
31- Meena R.S., Meena V.S., Meena S.K., and Verma J.P .2015. Towards the plant stress mitigate the agricultural productivity: a Book Review 102: 552–553.
32- Marius S., Octavita A., Eugen U., and Vlad A. 2005. Study of a microbial inoculation on several biochemical indices in sunflower (*Helianthus anuus* L.) in salt stress. Genetica si Biologie Moleculara 11-14.
33- Mehta S., and Nautiyal C. S. 2001. An efficient method for qualitativa screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiology 43: 51-56.
34- Mohapatra B., Verma D.K., Sen A., Panda B.B., and Asthie B. 2013. Biofertilizers- a gateway of sustainable agriculture. Popular Kheti 1: 97–106.
35- Mitra D., Sharma K., Uniyal N., Chauhan A., Sarkar P. 2016. Study on plant hormone (indole-3- acetic acid) producing level and other plant growth promotion ability (pgpa) by Asparagus racemosus rhizobacteria. Journal Chem Pharm Research 8: 995–1002.
36- Narula N., Kumar V., Behl R. K., Deubel A., Gransee A., and Merbach W. 2000. Effect of P-solubilizing Azotobacter chroococcum on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. Plant Nutrient Soil Science 163: 393–398.
37- Nehra V., and Choudhary M. 2015. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and

their biological approach towards the production of sustainable agriculture. Journal of Applied and Natural Science 7(1): 540-556.
38- Nosrati R., Owlia P., Saderi H., Rasooli I., and Malboobi M.A. 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil Azotobacter strains. Iranian Journal of Microbiology *6*(4): 285.
39- Panwar M., Tewari R., Gulati A., and Nayyar, H. 2016. Indigenous salt-tolerant rhizobacterium Pantoea dispersa (PSB3) reduces sodium uptake and mitigates the effects of salt stress on growth and yield of chickpea. Acta Physiologiae Plantarum 38(12): 278.
40- Parihar P., Singh S., Singh R., and Prased S. 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies. Enviromental science and Pollution Research 22:4056-4075.
41- Pessarakli M.ed., 2016. Handbook of plant and crop stress. CRc press.
42- Peng Y.L., Gao Z.W., Gao Y., Liu G.F., Sheng L.X. and Wang D.L. 2008. Ecophysiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. Journal of Integrative Plant Biology 50 (1): 29-39.
43- Rais L., Masood A., Inam A., and Khan N. 2013. Sulfur and nitrogen co-ordinately improve photosynthetic efficiency, growth and proline accumulation in two cultivarsof mustard under salt stress. Plant Biochemistry and Physiologye.
44- Rai S.N., and Gaur A.C. 2001. Characterization of Azotobacter SPP and effect of Azotobacter and Azospirillum as inoculant on the yield and N Uptake of wheat crop. Plant Soil 109: 131-134.
45- Santi C., Bogusz D., and Franche C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Annals of Botany 10: 1–25.
46- Sayed A.V., and Hossein A.F. 2011. Investigation of biofertilizers influence on quantity and quality characteristics in *Nigella sativa* L. Journal of Horticulture and Forestry 3- 3: 88–92.
47- Saxena B., Shukla K., and Giri B., 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Tolerance of Salt Stress in Plants. Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants 24: 67-97.
48- Spaepen S., and Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3(4): a001438.
49- Yildirim E., Turan M., and Donmez M. 2008. Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus sativus* L.) by plantgrowth promoting rhizobacteria. Rumanian Biotechnological Letters 13-5: 3933-3943.
50- Zaki H.E., and Yokoi S. 2016. A comparative in vitro study of salt tolerance in cultivated tomato and related wild species. Plant Biotechnology 33(5): 361-372.
51- Zarea M.J., Hajinia S., Karimi N., Mohammadi Goltapeh E., Rejali F., and Varma A. 2012. Effect of Piriformospora indica and Azospirillum strains from salineor non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. Soil Biology and Biochemistry 45: 139–146.
52- Zahir Z.A., Ghoni U., Naveed M., Nadeem S.M., and Asghar H.N. 2009. Comporative effectivness of pseudomonas and serratia sp. Containing ACC-diaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. Archives of Microbiology 191(5): 415-424.

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 3, July-August 2020, p. 649-660

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۹، ص. ۶۶۰-۶۴۹

Effect of *Azotobacter* and *Azospirillum* on Growth and Physiological Characteristics of Barley (*Hordeum vulgare)* under Salinity Stress

R. Khodadadi[1]- R. Ghorbani Nasrabadi[2*]- M. Olamaee[3]- S.A Movahedi-Naini[4]
Received: 23-06-2019
Accepted: 12-04-2020

Introduction: Worldwide studies have shown that inappropriate land uses over the past 45 years have resulted in salinization of 6% of the world's land. Salinity has negative effects on soil physicochemical properties and microbial activities. The imbalance in nutrient uptake, ion toxicity and decreasing water consumption due to high osmotic pressure are resulted from high accumulation of solutes in soil solution. One of the strategies to mitigate soil salinity is the inoculation of crops with different types of beneficial soil bacteria and fungi. Plant growth promoting bacteria (PGPB) are a diverse group of bacteria capable of promoting growth and yield of many crops. The most important growth promoting mechanisms of bacteria are the ability to produce plant hormones, non-symbiotic nitrogen fixation, solubilization of insoluble phosphate and potassium, biocontrol of plants pathogens through producing hydrogen cyanide and siderophore production. Plant inoculation with growth promoting bacteria causes an increase in several indices such as shoot fresh and dry weight, root dry weight and volume as well as chlorophyll content. The synergetic effect of *Azotobacter* and *Azospirillum* on the plant has been documented by increasing the absorption of nutrients, production of hormones that stimulate plant growth such as auxin, and influencing the root morphology. Due to the wide area of saline soils, appropriate methods to reduce the negative effects of salinity are of great significance. Given the importance of using bacteria adapted with climatic conditions and soil ecosystems in each region, as well as the efficiency of the combined application of growth promoting bacteria, this study was conducted to investigate the effect of growth promoting bacteria as a single and combined application at two levels of salinity calculated based on the threshold of barley yield reduction (Karoon cultivar) and 50 % reduction in barley yield.

Materials and Methods: In order to record the *Azotobacter* isolates, 15 soil samples were collected from salt affected lands of Golestan province. Thirty two *Azotobacter* isolates were isolated by physiological and biochemical tests and cyst production in old culture. Then, their ability to grow in different concentrations of salinity, drought stress tolerance, polysaccharide production, auxin production, phosphorus and potassium solubilization, hydrogen cyanide synthesis and biological fixation of molecular nitrogen were investigated. Based on physiological and growth stimulation tests, Az13 isolate was selected as the superior isolate of *Azotobacter* for greenhouse test. *Azospirillum* superior isolate was then prepared from the microbial bank of Soil Science Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. A soil with 16 dS/m salinity was selected to determine the effects of experimental treatments at two threshold salinity levels of yield reduction and 50 % reduction of barley yield. Then, soil salinity was reduced to 8 dS/m (yield reduction threshold) by leaching. After reaching to the desired salinity, the soil was removed from the pots and air dried. The sample was sifted through a 2 - mm sieve and again transferred to the pots. The barley seeds, Karoon cultivar, were used. To prepare the inoculum, firstly the bacterial isolates were grown in the pre-culture nutrient broth medium, and then incubated at 120 rpm in a shaking incubator at 28°C for 48 hours. Afterwards, each seed was inoculated with one milliliter of the bacterial inoculant with a population of 10^9 CFU/ml. This experiment was conducted as factorial in a completely randomized design with three replications in the greenhouse at Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The treatments included four levels of bacteria (without inoculation, *Azotobacter* inoculation, *Azospirillum* inoculation, combined inoculation of *Azotobacter* and *Azospirillum*) and two levels of salinity (8 and 16 dS/m). After 70 days (late vegetative growth period), some growth and physiological indices and concentration of nutrients uptake were measured.

Results and Discussion: The results showed that salinity stress had a significant ($p < 0.01$) negative effect on growth and physiological traits and nutrient uptake of the plant. The combined application of *Azotobacter* and

---

1, 2, 3 and 4- Ph.D. Student, Assistant Professor and Associate Professors Department of Soil Science, Gorgan Universitu of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: rgnasr@yahoo.com)
DOI: 10.22067/jsw.v34i3.81093

Azospirillum bacteria showed a positive significant influence ($p < 0.01$) on growth, dry weight, and root dry weight in the plant under salinity stress. The combined application of bacteria increased the chlorophyll a, b and a + b content at a salinity level of 16 dS/m by 136.49, 117.86 and 127.97 %, respectively. The combined application of bacteria resulted in a 65.39 and 55.94 % increase in proline amino acid content at salinity levels of 8 and 16 dS/m, respectively. The results revealed that nitrogen, phosphorus and potassium levels increased by 81.97, 80 and 66.67%, respectively, at 16 dS/m salinity level in combined application of both bacteria. Sodium ion accumulation in all bacterial treatments decreased in both salinity levels compared to control treatment and the highest reduction was observed in combined bacterial inoculation. These findings underline the positive effect of bacterial inoculation, particularly their combined application, on the growth and nutrients uptake of barley under salt stress.

Conclusion: Our results indicate that increasing salinity level significantly decreased shoot dry weight, root dry weight, plant height, chlorophyll content and nutrient concentrations of barley. Inoculation of salt-resistant bacteria, including *Azotobacter* and *Azospirillum*, reduced the adverse effects of salinity on growth and physiological traits, which was more pronounced in *Azotobacter* than *Azospirillum*. The combined application of *Azotobacter* and *Azospirillum* had a significant effect on root dry weight, plant height, chlorophyll content, increasing nutrient concentration efficiency (nitrogen, phosphorus, and potassium) and decreased sodium concentration at both salinity levels (8 and 16 dS/m) compared with the individually inoculated bacteria. Hence, the application of *Azotobacter* and *Azospirillum* isolates is an appropriate method for pot experiments with saline soils. To apply these results, field experiments in saline soils must be carried out to evaluate the effect of these bacterial isolates on the crop growth, yield and physiological characteristics.

Keywords: Chlorophyll, Plant growth promoting, Proline, Salinity